

はじめに

嗅覚受容体は生物のニオイセンサーとしてはたらく7回膜貫通タンパク質です。主に、鼻の中に存在する嗅神経細胞の細胞膜に存在し、嗅覚受容体が環境中のニオイ分子と選択的に結合すると、細胞内シグナル伝達が生じます。嗅神経細胞で生じたシグナルは、嗅球を経て最終的に脳へ伝わることで、生物はニオイを知覚しています。嗅覚受容体をコードする遺伝子はとても多く、ヒトでは約400種、マウスでは約1200種の嗅覚受容体があり、さらに、1つの嗅覚神経細胞には1種類の嗅覚受容体のみが選択的に発現し機能しています。つまり、1つの嗅覚受容体が1つのニオイセンサー素子として機能し、鼻の中では無数のセンサー素子が同時に機能していることとなります。また、1つの嗅覚受容体が複数のニオイ分子と結合することができること、1つのニオイ分子は複数の嗅覚受容体を刺激できることから、全ての嗅覚受容体の応答パターンを集約・分析することで、ニオイを捉えていると考えられています。

嗅覚が認識する物質は全てニオイ分子であり、ニオイ分子には水に溶けにくい化合物も非常に多くあります。個々の嗅覚受容体のリガンド探索などを行う際には、異種細胞で発現させたOR (Olfactory receptors)のリガンド応答をcAMP生産に伴って発現するレポーター遺伝子の発現で評価するのが一般的です (Dual-Glo luciferaseアッセイなど)。この場合、培地中でリガンド刺激を行う必要があるため、多くの場合、ニオイ分子を培地に溶かして、その溶液で嗅覚受容体を刺激するという手法が取られていました。一方、実際の嗅覚では空気中に漂うニオイ分子は嗅神経細胞の表層を多く嗅粘液に溶け込み、応答する受容体がある場合には瞬時に認識されます。

筆者らは、GloSensor™ cAMP Assayを用いることで、ニオイの溶け込みを再現し、リアルタイムでの検出を可能とするより動物本来の嗅覚応答に近い新規の嗅覚受容体リガンド応答試験Vapor stimulation アッセイを行うことに成功しました。本手法は、嗅覚受容体のリガンド探索手法としてだけでなく、嗅粘液等の外環境の嗅覚に与える影響の解析、ニオイを頼りにしている官能評価の模倣など多くの分野の進展のツールとなりうることを期待されるため、紹介させていただきます。

1. Vapor stimulationアッセイシステムの概要 (図1)

細胞としては、評価したい嗅覚受容体の発現プラスミド、ORシャペロンであるRTP1S (Receptor transporting protein 1S) の発現プラスミドに加え、pGloSensor™-22F cAMP Plasmidを共トランスフェクションさせます。翌日、GloSensor™ cAMP Assayのマニュアルに従い、基質の平衡化を行います。

気相からの刺激を行うため、ルシフェラーゼ発光の測定を開始する前に、測定したいニオイ分子溶液を分注した別の96ウェルプレートを手前リーダー内に挿入し、一定時間置くことニオイが充満した環境を測定部に作ります。そして、一定時間経過後に、嗅覚受容体発現細胞を培養しているプレートを手前リーダーに入れ、ルシフェラーゼ発光の経時測定を開始します。時間経過とともに気相中のニオイ分子が細胞を覆っている溶液層に溶け込み、細胞に発現している嗅覚受容体はそのニオイ分子に応答する場合に、細胞内で生じる発光を検出する仕組みです。

気相中のニオイ分子検出では嗅覚受容体の溶け込んだニオイ分子応答をリアルタイムで検出することが重要になるため、Glosensorを利用しています。GlosensorはcAMP結合ドメインが組み込まれており、通常時は不活化状態になっています。細胞に発現させた嗅覚受容体がニオイ分子で刺激され、細胞内にcAMPが産生されると、cAMPとGlosensorが結合するとルシフェラーゼ活性が復活するため、ルシフェラーゼ-ルシフェリン反応による生物発光が短時間で生じます。

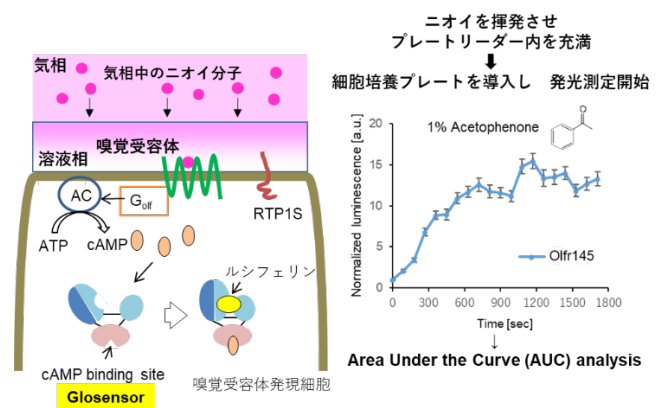


図1 Vapor stimulation Glo sensor assayの概要

ORsとcAMP依存型ルシフェラーゼを共発現させ、気相から溶け込んだ匂い分子にORが応答するとルシフェラーゼが活性化される。匂い分子の曝露後、ルシフェラーゼ発光を経時的に測定し、AUC分析によって各ORsの匂い分子応答を数値化する。右図では、1%のアセトフェノン溶液から気化した匂い分子に対するOlfr145のリアルタイムの応答を例示している。感度の良いORと匂い分子の組では100秒程度でも有意なルシフェラーゼ発光を検出できる。

2. 気相中のニオイ分子の検出と識別

まず、マウスやヒトの嗅覚受容体の中から実験に用いたい嗅覚受容体を選抜します。96ウェルプレートでTriplicateをすることが好ましいため、最大31種類の受容体を選択できます。この31種類の嗅覚受容体とコントロール1種類を個々に発現させた細胞を96穴プレートで培養します。試験で用いた嗅覚受容体が気相中のニオイ分子に反応するか試験したところ、多くのニオイ分子で0.01%以下の溶液からの揮発した成分に対し複数の嗅覚受容体発現細胞が濃度依存的な反応を示すことが分かりました。中には0.0001%のニオイ溶液の揮発成分を検出できる高感度な嗅覚受容体や1分程度で検出できるニオイ分子-嗅覚受容体の組み合わせもありました(図2)。また、31種類の嗅覚受容体の反応の違いを総合的に分析することで、メチル基1つだけ構造の異なる分子を識別できることが分かりました。

気相中のニオイ分子の嗅覚受容体発現細胞でのリアルタイムでの検出と、嗅覚受容体細胞パネルによるにおい分子の識別をGloSensor™を用いることで実現しました。

またこの手法は、細胞を覆っている液相中に他のタンパク質などを添加することができます。マウスの嗅覚神経細胞を覆う嗅粘液に含まれる代謝酵素が存在することが分かっています。実際に、代謝酵素の1つを実験したところ、ニオイ分子に対する反応が変化する嗅覚受容体があることを示し、面白いことに、この代謝酵素による変化も嗅覚受容体毎に異なるデータがこのアッセイ手法を行うことで得られました。

Olfr1377のアセトフェノン応答

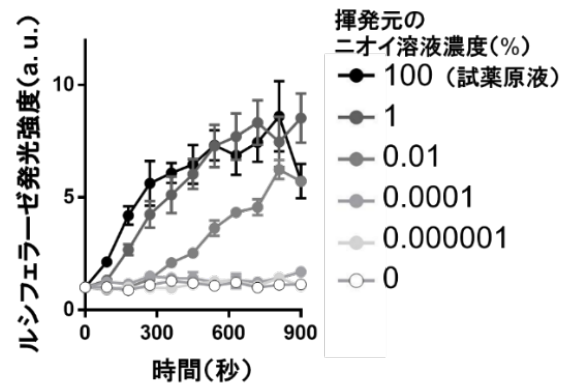


図2 嗅覚受容体の気相中のニオイ分子反応試験結果 横軸：気相刺激を開始してから時間、縦軸：ルシフェラーゼ発光強度

こんなところで苦労しました

研究室でも様々な匂いが常日頃から漂っています。そのため、反応の良い嗅覚受容体を用いた場合は、中には、前日に実験で使用したニオイや、ほかの研究者が使っている試薬のニオイに反応してしまう場合もあり、実験環境を普段よりも整える必要があります。プレートリーダー内部に残存してしまうニオイを実験後にエアブローすることで洗浄することが必須です。また、トランスフェクション後の細胞をできるだけ他のニオイに触れないように独立したインキュベーターで培養するなど、予期せぬニオイとの接触をできるだけ避けるようにする工夫を行うことが苦労しました。

参考文献

1. Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell 65, 175-187 (1991)
2. Serizawa S, Miyamichi K, Sakano H. One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. Trends in genetics : TIG 20, 648-653 (2004)
3. Zhuang H, Matsunami H. Evaluating cell-surface expression and measuring activation of mammalian odorant receptors in heterologous cells. Nat Protoc. 3(9). 2008
4. Kida H*, Fukutani Y*, Mainland* J.D, de March CA, Vihani A, Li YR, Chi Q, Toyama A, Liu L, Kameda M, Yohda M and Matsunami H, * Equal contribution Vapor detection and discrimination with a panel of odorant receptors, Nat. commun, 9(1): 4556 (2018)
5. de March CA, Fukutani Y, Vihani A, Kida H and Matsunami H, Real-time in vitro monitoring of odorant receptor activation by odorant in vapor phase. Journal of Visualized Experiments 146, e59446 (2019).

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号
pGloSensor™-22F cAMP Plasmid	20 µl	E2301
GloSensor™ cAMP Reagent	25 mg	E1290

製品名	サイズ	カタログ番号
NanoBIT® PPI MCS Starter System	1セット	N2014
NanoBIT® PPI Flexi Starter System	1セット	N2015

日本語 Web site : www.promega.jp

テクニカルサービス ● Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 ● E-mail: prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

*製品の仕様、価格については2019年8月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店：